肥须亚麻蝇幼虫不同发育阶段气门形态学变化

王　玲[1]，刘　彬[2]，王　贺[1]，李泽民[1,*]，赵　静[3]

（1. 河北医科大学病原生物学教研室，石家庄　050017；2. 河北医科大学基础所生化研究室，石家庄　050017；3. 河北医科大学组织胚胎学教研室，石家庄　050017）

摘要：为了满足实际工作中利用蝇类幼虫日龄推断尸体死后间隔时间的需求，本文采用显微镜观察不同龄期肥须亚麻蝇 *Parasarcophaga crassipalpis*（Macquart）幼虫气门的形态学变化，通过计算机图像分析系统对幼虫的前、后气门等可用于判断幼虫生长发育的形态学指标进行测量。结果表明：肥须亚麻蝇幼虫前、后气门随时间而发生规律性的变化，幼虫前气门色素管部的平均光密度及其长宽比，以及后气门的平均光密度这 3 项指标是推算幼虫日龄较理想的指标，对法医学中尸体死亡时间的推测具有重要的指示意义。此外，叠龄期作为幼虫发育的必经阶段，可为特殊时间点的推测提供可靠依据。

关键词：尸食性蝇类；肥须亚麻蝇；幼虫形态；死后间隔时间；气门

中图分类号：D918　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2008)07-0707-07

Chronometrical morphology changes of larval spiracle at different developmental stages of *Parasarcophaga crassipalpis*（Macquart）(Diptera：Sarcophagidae)

WANG Ling[1], LIU Bin[2], WANG He[1], LI Ze-Min[1,*], ZHAO Jing[3] (1. Department of Pathogenic Biology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Institute of Basic Medical Science, Department of Molecular Biology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 3. Department of Histology and Embryology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract: Larval spiracle morphology of *Parasarcophaga crassipalpis* (Macquart) was studied in detail under microscope, and the corresponding morphological indexes were collected and analyzed by digital image processing equipment. The results showed that structural traits of anterior and posterior spiracles regularly changed along with larval growth. When the 2nd and 3rd instars overlapped, special morphological features occurred. This stage could be an ideal age indicator to determine the decisive time for possible use in forensic entomology. Measurements of the ratio of length and width of anterior spiracle chamber and the average optical density of anterior and posterior spiracles were confirmed as larval age markers. This study further confirms the correlation between morphological indexes and postmortem interval as long as the investigator accounts for the development data of the species.

Key words: Necrophagous flies; *Parasarcophaga crassipalpis*; larval morphology; postmortem interval; spiracle

近年来，利用尸体上蝇类的生长发育情况来推断死亡时间受到法医工作者的重视并逐步应用到一些实际案件中。虽然蝇类体长和体重等指标的变化对于推断死后间隔时间具有一定的作用，但它们过于粗放，难以满足法医学的需求（Williams，1984；Nishida *et al*.，1986；Devies and Rarcliffe，1994）。目前，关于幼虫龄期的鉴定尤其是日龄的区分成为研究的热点，许多学者尝试从不同角度寻找日龄推测的新指标，包括如中肠前端空隙的有无、嗉囊长度的变化、体壁表皮生长层数的变化等（Reiter，1984；Greenberg，1991；马玉□等，2001）。此外，根据昆虫体内的一些生化成分，如喋啶、表皮碳氢化合物、血

作者简介：王玲，女，1981 年生，山东人，博士，主要从事法医昆虫学研究，E-mail：wangling1981@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail：lizemin1952@yahoo.com.cn

收稿日期 Received：2007-10-30；接受日期 Accepted：2008-05-12

淋巴等，来推测日龄也受到大家关注（Moon and Krafsur，1995；Desena *et al.*，1999；朱光辉等，2004）。但由于这些指标的变化和时间推移的相关性不强，给实际的应用带来了一定的局限性。

以往研究证实，蝇类幼虫的某些体表形态学指标随着时间变化具有一定规律性（王江峰等，2002a，2002b），因此我们选取肥须亚麻蝇 *Parasarcophaga crassipalpis*（Macquart）幼虫体表的前、后气门作为研究对象，采用形态观察与图像分析技术相结合的方法筛选适合日龄推断的指标，为法医学中根据幼虫的生长情况精确地推断出尸体的死亡时间提供一定的理论依据。

1　材料与方法

1.1　供试虫源采集与饲养

肥须亚麻蝇成蝇采自河北医科大学校园。蝇种鉴定按照《中国蝇类检索表》（范滋德，1992）系统分类法进行。

将采集到的成蝇带回实验室饲养，收集羽化的成蝇，待其性成熟后，放入新鲜猪肉诱成蝇产幼虫，然后跟踪它们的整个发育过程，连续饲养 3 代后开始实验。记录幼虫的产出时间，分别放置于 16，20，24，28 和 32 ± 1℃的生化培养箱中，相对湿度 65%，光周期为 L∶D = 12∶12，饲以瘦猪肉。观察期间每 12 h 留取标本一次，每组每次留取 10 头直至 50% 以上的幼虫化蛹为止。用于叠龄期观察的标本待幼虫进入 2 龄末期时改为每 1 h 留取标本一次。所有幼虫标本保存于 70% 的酒精和甘油混合液中，待镜检观察。

1.2　方法

1.2.1　解剖观察：将幼虫标本放于盛有 70% 酒精的蜡盘中，在体视显微镜下（OLYMPUS，SZX9）利用解剖剪、手术刀选取第 1 胸节至第 3 胸节的中间部分（供前气门标本制作）和第 8 腹节之后的部分（供后气门标本制作）作为研究对象。不同部位标本分类收集后通过 10% KOH 溶液消化后乙醇梯度脱水，加拿大树胶制成封片标本，在光学显微镜（OLYMPUS，CX21）下观察、拍照。龄期的界定主要依据幼虫不同龄期前、后气门的形态特征进行区分（范滋德，1992；胡萃，2000）。

1.2.2　幼虫形态特征的提取：利用计算机图像分析系统（捷达图像分析系统，JD-801）分别对不同日龄幼虫的图像处理和进行特征提取。通过对图像像素点代表的实际尺寸进行标定和滤波去除噪声等方法获得前气门色素管部的面积、平均光密度及其长宽比；后气门横径、间距及平均光密度 6 项指标。每处理组观察 10 头幼虫，每个特征值重复测量 3 次，取其均值作为结果。

面积：即所选图像内所有像素点之和乘以每个像素点所代表的实际面积。

前气门色素管部长宽比：前气门色素管部长度最大值与宽度最大值的比值。

后气门横径：后气门宽度的最大值。

后气门间距：两个后气门内缘开口端之间的距离。

光密度（D）：即检测部位在同一光源下吸收或透过光的数值。

$D = \log \frac{I_1}{I_2} = \log \frac{1}{T}$，$0 < D < \infty$，在标本不透明时，$D = \infty$，其中 I_1 是入射光的吸光度值，I_2 是透射光的吸光度值，T 是透光率。

$$\text{平均光密度} = \frac{\sum_{i=0}^{255} i \times P_i}{\sum_{i=0}^{255} P_i}$$

其中 P_i 是灰度为 i 的像素点数。

1.3　数据统计与分析

分别测量前气门和后气门有关的形态学数据，应用 SPSS 11.5 统计软件进行处理，并对不同温度条件下各项指标的变化进行单因素方差（one way ANOVA）分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果与分析

2.1　幼虫前、后气门的形态观察

1 龄幼虫：前气门未出现。后气门仅为 1 裂，无气门环，气门裂较宽，呈淡黄色（图 1：A）。

2 龄幼虫：2 龄初期幼虫出现前气门，孔突 9～13 个，呈一排。前气门色素管部细长，呈淡黄色。2 龄期幼虫的后气门呈开放的环形，淡褐色，具 2 裂。气门环的内缘和外缘比较显著，内缘没有达到内气门裂下端，背腹两缘不显著，腹缘达到外气门裂下端、开口较宽（图 1：B，C）。

3 龄幼虫：前气门孔突数目与 2 龄幼虫相同，色素管部变短、增粗，随着时间的延长颜色逐渐加深。后气门为 1 孔 3 裂，较 2 龄期明显增大，颜色较深，呈黄褐色或棕褐色。气门环近圆形、两端膨大，其内缘直、与背缘几乎成直角，腹缘较平，但仍未达到内

气门裂下端。气门裂直而细长(图 1:D, E, F)。

2.2 不同温度下幼虫前、后气门发育至叠龄期的时间及形态特征

叠龄期是肥须亚麻蝇幼虫发育过程中的特殊阶段,具体是指在不同龄期更替时幼虫某些形态特征同时出现的时间。在供试的 5 组恒定温度下,每组幼虫在 3 龄初均出现了与 2 龄末气门共存的现象。随着温度的升高,幼虫发育至叠龄期的时间逐渐缩短。16℃ 至 32℃,幼虫出现叠龄期的时间依次为 123 ± 2, 95 ± 1, 75 ± 2, 39 ± 1 和 28 ± 1 h。

图 1(G)所示为幼虫前气门叠龄期时的形态特征,此时 2、3 龄幼虫前气门重叠,由图可见,2 龄幼

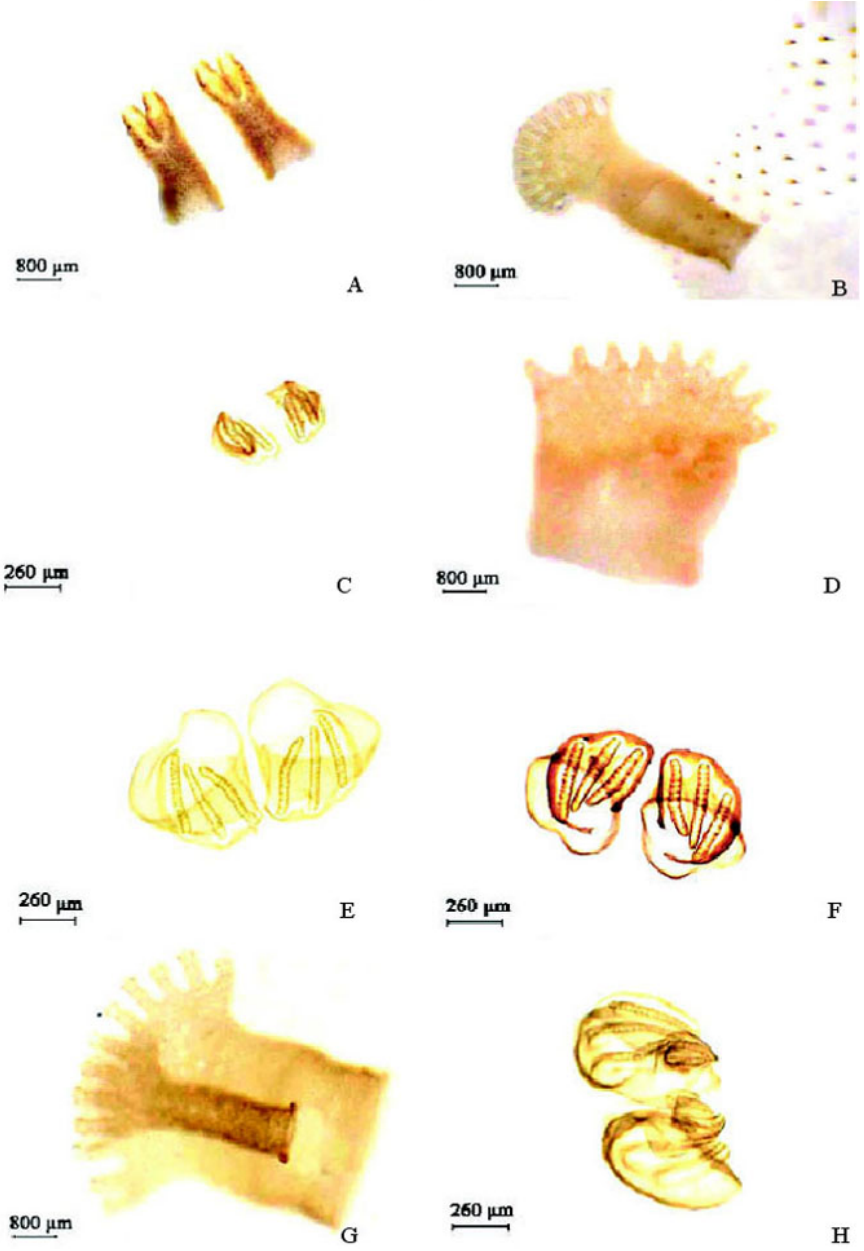

图 1　不同发育时期肥须亚麻蝇幼虫气门的形态变化

Fig. 1　The spiracle morphology changes of *Parasarcophaga crassipalpi* larva at different developmental stages

A:1 **龄期幼虫后气门** Posterior spiracle morphology of the 1st instar larva; B:2 **龄期幼虫前气门** Anterior spiracle morphology of the 2nd instar larva; C:2 **龄期幼虫后气门** Posterior spiracle morphology of the 2nd instar larva; D:3 **龄期幼虫前气门** Anterior spiracle morphology of the 3rd instar larva; E:3 **龄初期幼虫后气门** Posterior spiracle morphology of the early stage of the 3rd instar larva; F:3 **龄末期幼虫后气门** Posterior spiracle morphology of the late stage of the 3rd instar larva; G:2, 3 **龄叠龄期前气门** Anterior spiracle morphology when the 2nd and 3rd instar overlapped; H:2, 3 **龄叠龄期后气门** Posterior spiracle morphology when the 2nd and 3rd instar overlapped.

虫前气门细长、较小，颜色深，而 3 龄幼虫前气门较大，颜色浅。图 1(H)所示为幼虫后气门叠龄期时的形态特征，2 龄幼虫后气门较小、颜色较深，为 2 裂；3 龄幼虫后气门较大、颜色淡，呈 3 裂。

2.3 不同温度幼虫前气门形态指征的变化

2.3.1 前气门色素管部面积的变化：1 龄幼虫没有前气门，故 16℃ 至 32℃ 5 组实验开始记录时间分别为 48，36，24，24 和 24 h。结果发现，2 龄初期各组前气门色素管部面积值均为最小，不同温度组均值间差异不具有显著性。随时间的延长各组数值迅速增加，分别于 132，96，84，48 和 48 h 达到峰值。随后各组色素管部面积值迅速下降，进入平台期，直至 3 龄末数值无明显变化(图 2：A)。

2.3.2 前气门色素管部平均光密度的变化：在 5 组恒温条件下，前气门色素管部的平均光密度随时间的延长呈持续性增加。2 龄初期各组均值最小，随着时间的延长各组数值迅速增加直至 2 龄期结束。进入 3 龄后各组平均光密度值增长速度较 2 龄期减慢，但在各个观察点温度较高组增长速度明显快于温度较低组，在 3 龄结束时各组数值均达到最大值(图 2：B)。

2.3.3 前气门色素管部长宽比的变化：在供试的 5 组恒温条件下，2 龄初期各组长宽比值最大，随着时间的延长数值逐渐下降。进入 3 龄后，各组前气门色素管部的长宽比值较 2 龄期下降的速度略有减慢，分别于 312，240，180，120 及 120 h 达到最小值。观察不同温度组数值后，我们还发现各组前气门色素管部长宽比均呈现出随温度升高而逐渐下降的变化规律(图 2：C)。

2.4 不同温度幼虫后气门形态指征的变化

2.4.1 后气门横径的变化：幼虫后气门横径随时间的延长呈阶段性增加，即在每个龄期内生长速度平稳、变化不明显，龄期更替时该值变化显著。进入 3 龄后各温度组幼虫后气门横径均值迅速达到最大，随后数值随时间的延长基本维持不变。在供试的 5 组温度下，幼虫后气门横径的发育速率随温度升高而加快，温度越高达到最大值的时间越短(图 3：A)。

2.4.2 后气门间距的变化：幼虫后气门间距的生

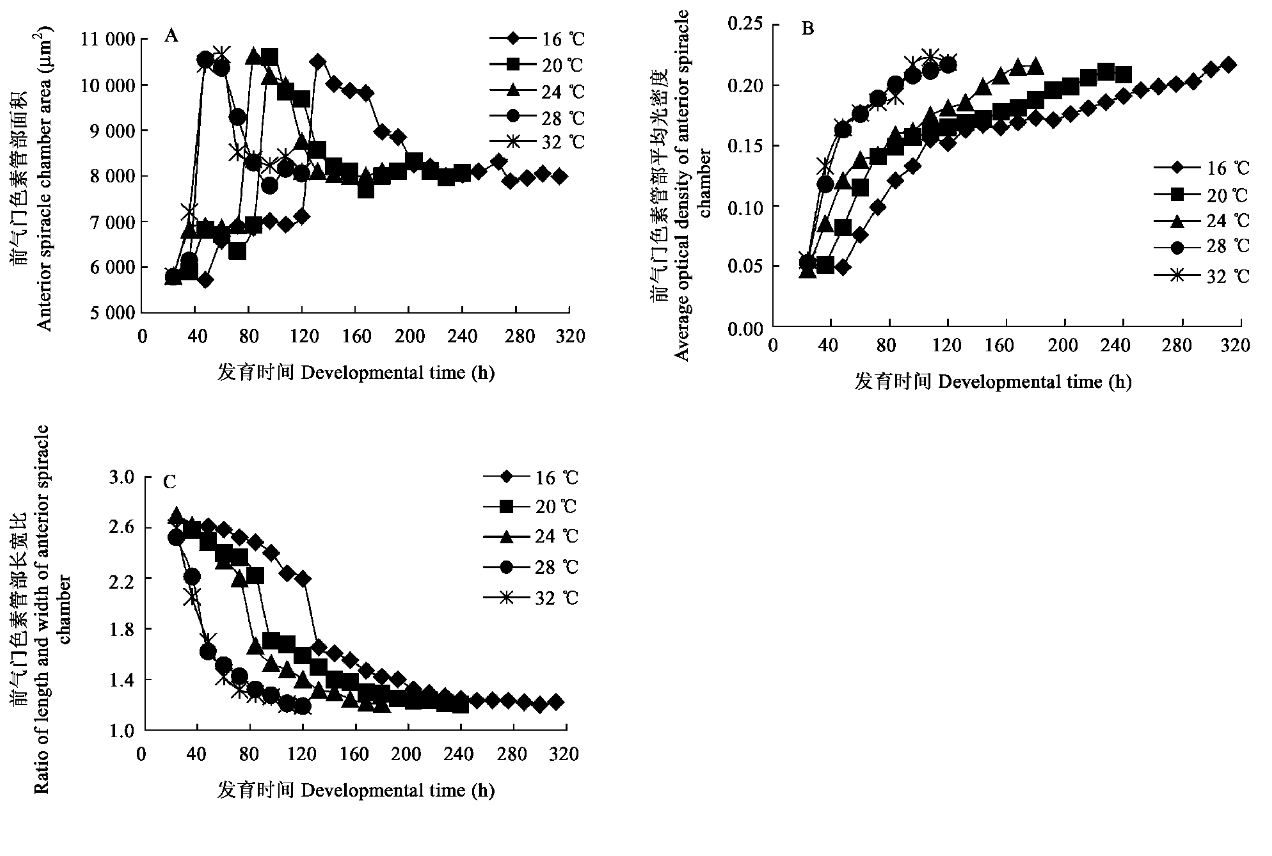

图 2 不同温度下肥须亚麻蝇幼虫前气门的增长曲线

Fig. 2 Growth curves of anterior spiracle of *Parasarcophaga crassipalpi* larva at different temperatures

A：**前气门色素管部面积的增长曲线** Growth curves of anterior spiracle chamber area；B：**前气门色素管部平均光密度的增长曲线** Growth curves of average optical density of anterior spiracle chamber；C：**前气门色素管部长宽比的增长曲线** Growth curves of ratio between length and width of anterior spiracle chamber.

长曲线在 5 组供试温度条件下呈现出规律性变化：在 12 h 时各组气门间距均值最小，进入 2 龄后各组后气门间距值迅速增加，并在短时间内达到该龄期的最大值。3 龄前期各组数值较 2 龄末的气门间距值小，但随时间的延长数值迅速增加，分别于 216，156，120，84 和 84 h 进入平台期，此后各组数值便在该平台期附近上下波动（图 3：B）。

2.4.3　后气门平均光密度的变化：5 组幼虫后气门的平均光密度与其前气门色素管部的平均光密度的变化趋势一致，均随着温度的升高呈持续性增长至 3 龄结束。然而该指标在幼虫各个龄期间更替时变化平缓，龄期内增长幅度较大，比色素管部的平均光密度更适于进行幼虫日龄的推测。在观察时间范围内，12 h 时各组平均光密度均值最小，分别为 0.112 ± 0.006，0.125 ± 0.009，0.136 ± 0.012，0.147 ± 0.016，0.156 ± 0.005，数值之间差异具有显著性（$P < 0.05$）。各组数值随时间的延长而逐渐增加，增长速率依次为 32℃组 > 28℃组 > 24℃组 > 20℃组 > 16℃组。5 种供试温度条件下各组数值均在 3 龄末达到各自最大平均光密度值（图 3：C）。

3　讨论

肥须亚麻蝇是一种常见的肉食性蝇类，地区分布十分广泛，生活史完全变态，幼虫常直接产于尸体的腐肉缝和自然孔口处，是最先到达尸体的蝇类之一（胡萃，2000）。本文对肥须亚麻蝇幼虫的形态学特征进行了观察和测量，以幼虫的前、后气门作为研究对象，为该蝇种日龄的推测提供一定的依据，在法医学中死亡时间的推断上具有重要的研究价值和广阔的应用前景。

气门作为蝇类幼虫的呼吸器官，主要作用是控制气体的出入和限制水分的过度蒸发。肥须亚麻蝇幼虫前气门位于第 1、2 胸节之间的两侧，后气门位

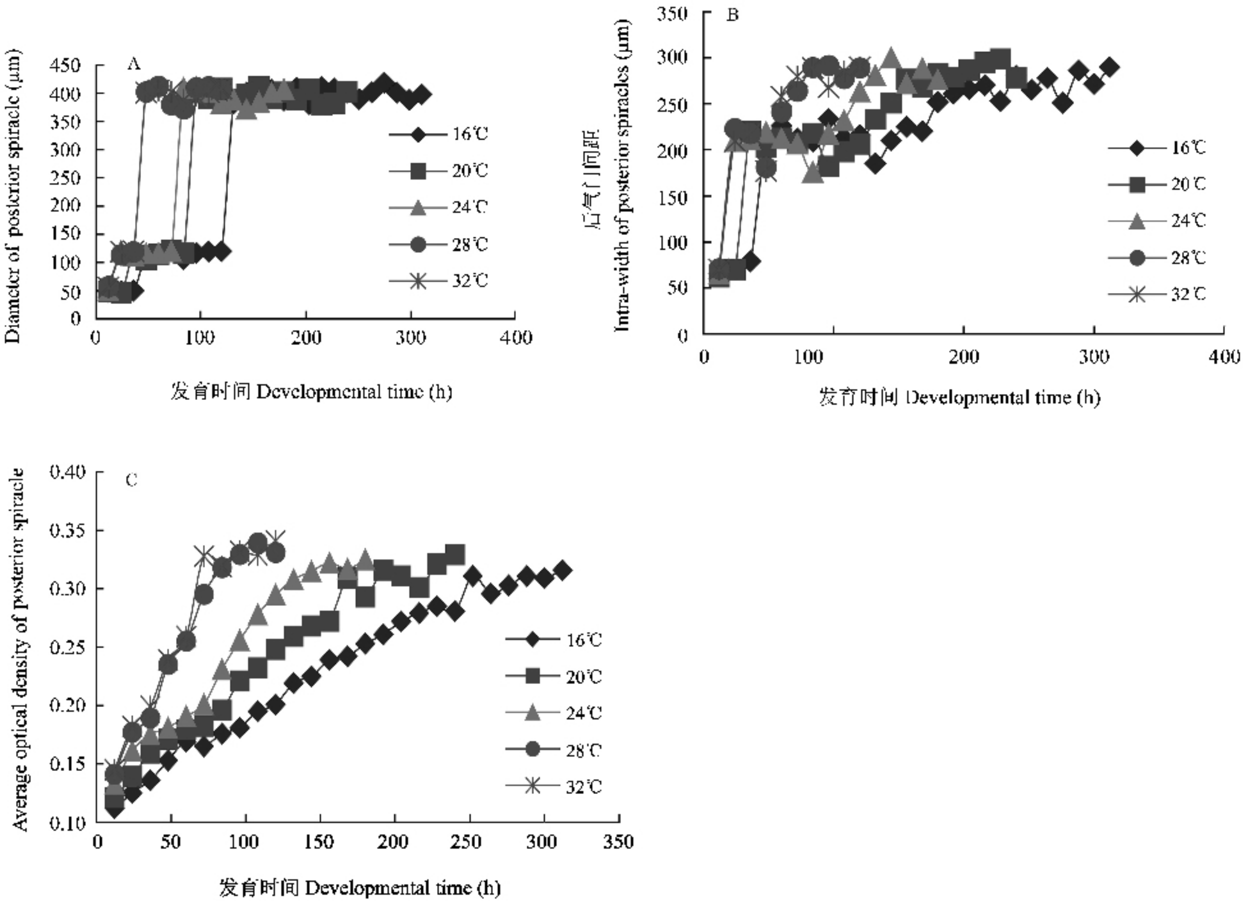

图 3　不同温度下肥须亚麻蝇幼虫后气门的增长曲线

Fig. 3　Growth curves of posterior spiracle of *Parasarcophaga crassipalpi* larva at different temperatures

A：**后气门横径的增长曲线** Growth curves of diameter of posterior spiracle；B：**后气门间距的增长曲线** Growth curves of intra-width of posterior spiracles；C：**后气门平均光密度的增长曲线** Growth curves of average optical density of posterior spiracle.

于幼虫第 8 腹节的后表面，两者均是幼虫龄期判断的主要标志。以往研究发现，蝇类前、后气门的形态变化具有一定的规律性，包括气门环的有无、完整与否、颜色深浅、线条粗细等。因此将气门的形态学变化应用在死后间隔时间的判断中，可起到提高死亡时间判断准确性的作用（王江峰等，2002b）。

研究中我们发现，肥须亚麻蝇幼虫前气门于 2 龄期出现，随着龄期更迭，前气门的颜色及形状均发生了规律性的变化。基于这些特点，本实验对其色素管部的面积、平均光密度及长宽比 3 项指标进行了测定。结果发现，色素管部平均光密度及其长宽比变化趋势较为单一，在整个幼虫发育的过程中始终保持上升或下降的趋势，并且龄期间数据过渡平缓、没有骤升骤降的变化，因此这两项指标适宜龄期的精确判断。同时我们测量了后气门横径、间距以及平均光密度 3 项指标，发现气门横径在每个龄期内没有显著的变化而仅在龄期更替时有所改变，不适于进行日龄的判断。后气门间距在 3 龄期内变化曲线呈现上升-下降-上升的波浪趋势，因此利用气门间距的大小推测日龄会有一定的困难，需要与其他辅助指标综合分析进行推断。由于肥须亚麻蝇的后气门为开放型，并且气门环及气门裂同步生长，于是我们还对气门环及气门裂的平均光密度进行测量和比较，发现在相同温度及时间的条件下，两者的结果相似，这提示在将来的工作中可以将气门环和气门裂的平均光密度等同考虑，不必分开进行研究。由于气门环仅出现在 2 龄期和 3 龄期，而气门裂却出现在整个幼虫的发育过程，因此测量气门裂的平均光密度具有更广泛的应用意义，并且可以作为后气门的平均光密度来使用。在本实验中，该指标随温度升高呈持续性增加，龄期更替时曲线变化平缓、规律性好，可作为日龄推测的适宜指标。

此外，我们还对肥须亚麻蝇幼虫叠龄期这个特殊的发育阶段进行了详细观察。结果发现，在各种供试温度下，2，3 幼虫龄期交替时都会出现两组前气门或后气门重叠的现象，温度越高该现象出现越早。由于 1，2 龄期更迭时较难观察到叠龄的形态，故本实验未进行讨论。叠龄期作为幼虫发育中的必经阶段，出现的时间相对固定，如果在案发现场的幼虫标本中发现存在这种特殊的形态特征，再结合当地的气温和环境，就可对该特殊时间点进行准确的推测，促进案件的侦破进程。

本实验主要应用图像分析技术对图像形态指标进行量化，消除了主观因素的影响，减少了生物显微镜测量的繁琐工作量，在形态学上实现了对肥须亚麻蝇进行日龄推测的可能性。但该实验中目标特征的提取是图像分析系统根据颜色阈值自动来确定的，虽进行了统一规定但仍有误差，若能通过数学方法推导出公式并进行相关的曲线拟合将更为准确、客观。此外，由于实际工作中各种因素错综复杂，包括环境温度、湿度、室内与室外等不同条件，都可能给尸食性蝇类幼虫的发育造成影响，因此需要综合性考虑全面分析，才能保证结论的准确性。

参考文献（References）

Desena ML，Clark JM，Edman JD，Symington SB，Scott TW，Clark GG，Peters TM，1999. Potential for aging female *Aedes aegypti*（Diptera：Culicidae）by gas chromatographic analysis of cuticular hydrocarbons，including a field evaluation. *J. Med. Entomol.*，36(6)：811–823.

Devies L，Ratcliffe G，1994. Development rates of some pre-adult stages in blowflies with reference to temperatures. *Med. Veter. Ent.*，8(2)：245–254.

Fan ZD，1992. Key to the Common Flies of China. 2nd ed. Science Press，Beijing. 829 pp.［范滋德，1992. 中国常见蝇类检索表. 第 2 版. 北京：科学出版社. 829 页］

Greenberg B，1991. Flies as forensic indicators. *J. Med. Ent.*，28(5)：565–577.

Hu C，2000. Forensic Entomology. Chongqing Press，Chongqing. 167 pp.［胡萃，2000. 法医昆虫学. 重庆：重庆出版社. 167 页］

Ma YK，Hu C，Hong J，Min JX，2001. The observation on the larval cuticle layer of *Aldrichina grahami*（Aldrich）. *Acta Parasit. Med. Entomol. Sin.*，8(1)：41–45.［马玉□，胡萃，洪健，闵建雄，2001. 巨尾阿丽蝇幼虫表皮几丁质片层的透射电镜观察. 寄生虫与医学昆虫学报，8(1)：41–45］

Moon RD，Krafsur ES，1995. Pterin quantity and gonotrophic stage as indicators of age in *Musca autumnalis*（Diptera：Muscidae）. *J. Med. Entomol.*，32(5)：673–684.

Nishida K，Shinonaga S，Kano R，1986. Growth tables of fly larvae for the estimation of postmortem intervals. *Ochanomizu Med. J.*，34：9.

Reiter C，1984. Zum Washstumsverhalten der Maden der blauen Schmeissfliege *Calliphora vicina*. *Zeitschrift für Rechtsmedizin.*，91：295–308.

Wang JF，Hu C，Chen YC，Min JX，Li JT，2002a. Chronometrical morphology of *Chrysomya megacephala* and its application on the determination of postmortem interval. *Acta Parasit. Med. Entomol. Sin.*，9(1)：33–38.［王江峰，胡萃，陈玉川，闵建雄，李俊涛，2002a. 大头金蝇 *Chrysomya megacephala* 幼虫发育形态学及其在死亡时间推断中的应用探讨. 寄生虫与医学昆虫学报，9(1)：33–38］

Wang JF，Chen YC，Min JX，Li JT，2002b. Chronometrical morphology of *Aldrichina grahami* and its application in the determination of postmortem interval. *Acta Entomol. Sin.*，45(2)：265–270.［王江峰，陈玉川，闵建雄，李俊涛，2002b. 巨尾阿丽蝇幼虫发育形

态学及其在死者死亡时间推断中的应用. 昆虫学报，45(2)：265－270]

Willams H，1984. A model for aging of fly larvae in forensic entomology. *Forensic Sci. Int.*，25(1)：191－199.

Zhu GH，Ye GY，Hu C，2004. Development profile of hemolymph soluble proteins during the larval and pupal stages in *Aldrichina grahami*. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*，30(1)：69－72. [朱光辉，叶恭银，胡萃，2004. 巨尾阿丽蝇幼期血淋巴可溶性蛋白组成的时间特征. 浙江大学学报，30(1)：69－72]

(责任编辑：袁德成)